

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

PCT ORGANACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)



<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C12N 15/62, 15/31, 15/48, C07K 14/22, 14/16, 16/12, 1/22, A61K 39/095, C12N 15/70, 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:19)</p>	A1	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 97/26359</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 24 de Julio de 1997 (24.07.97)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/CU97/00001</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 17 de Enero de 1997 (17.01.97)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: 10/96 17 de Enero de 1996 (17.01.96) CU</p> <p>(71) Solicitante (<i>para todos los Estados designados salvo US</i>): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB) [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacan, Playa, Ciudad Habana 12100 (CU).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (<i>sólo US</i>): DUARTE CANO, Carlos Antonio [CU/CU]; Apartamento 12, Avenida 31 No. 18307, Cubanacan, Playa, Ciudad Habana 12100 (CU). GUILLEN NIETO, Gerardo Enrique [CU/CU]; Linea No. 6, entre N y O, Piso 4, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad Habana 10400 (CU). ALVAREZ ACOSTA, Anabel [CU/CU]; Apartamento 1, Calle 184 No. 3112, Playa, Ciudad Habana 12100 (CU). CARPIO MUÑOZ, Emilio Luis [CU/CU]; Edificio 12 plantas, Apartamento 507, Olivos 1, Sancti Spiritus 60100 (CU). QUINTANA VAZQUEZ, Diógenes [CU/CU]; Calle Indalecio Sobrado No. 71, Pinar</p>		
<p>del Rio 20100 (CU). GOMEZ RODRIGUEZ, Carmen Elena [CU/CU]; Calle Pasaje Molina No. 5, Guanabacoa, Ciudad Habana 11100 (CU). SILVA RODRIGEZ, Ricardo de la Caridad [CU/CU]; Avenida 15 No. 4209, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU). NAZABAL GALVEZ, Consuelo [CU/CU]; Avenida 51 No. 31, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU). LEAL ANGULO, María de Jesús [CU/CU]; Calle 186 No. 3115, Playa, Ciudad Habana 12100 (CU). MARTIN DUNN, Alejandro Miguel [CU/CU]; Apartamento 11B, Calle 15 No. 9, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad Habana 10400 (CU).</p> <p>(74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga, Lidia; Lex, S.A., Avenida 31 No. 1001, Esquina 10, Miramar Playa, Ciudad Habana 11300 (CU).</p> <p>(81) Estados designados: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, SI, US, Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i></p>		
<p>(54) Title: SYSTEM FOR THE EXPRESSION OF HETEROLOGOUS ANTIGENS AS FUSION PROTEINS</p> <p>(54) Título: SISTEMA DE EXPRESION DE ANTIGENOS HETEROLOGOS COMO PROTEINAS DE FUSION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention relates to biotechnology and genetic engineering, particularly the expression of heterologous proteins in microorganisms through their fusion, by applying the recombinant DNA technology, to bacterial peptides. The present invention provides an efficient process for the expression in <i>Escherichia coli</i> of heterologous proteins as fusion polypeptides with a view to obtaining them with a high degree of purity, in commercially useful amounts, and in an appropriate form for their inclusion in vaccine preparations intended to human use. To this effect, what is essentially used is a stabilizing sequence derived from the first 47 aminoacids of the antigen P64k of <i>Neisseria meningitidis</i> B:4 :P1.15. In particular, use is made of a recombinant plasmide containing said sequence, under the control of the triptophane promotor of <i>E. coli</i> and of the terminator of the transcription of the phage T4, including restriction sites which provide for the cloning in phase of DNA fragments coding for polypeptides of interest. The process of the invention is applicable to the pharmaceutical industry, for the development of diagnostic systems, vaccine preparations, and in any situation where it is required to obtain high amounts of heterologous proteins as fusion polypeptides in <i>E. coli</i>.</p> <p>(57) Resumen</p> <p>La presente invención está relacionada con la rama de la biotecnología y la ingeniería genética, particularmente con la expresión de proteínas heterólogas en microorganismos mediante su fusión, usando la tecnología del ADN recombinante, a péptidos bacterianos. Mediante la presente invención se proporciona un procedimiento eficaz para la expresión en <i>Escherichia coli</i> de proteínas heterólogas como polipéptidos de fusión con vistas a su obtención con un alto grado de pureza, en cantidades comercialmente útiles, y de forma que permita su inclusión en preparados vacunales destinados al uso en humanos. Para ello se emplea esencialmente una secuencia estabilizadora derivada de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k de <i>Neisseria meningitidis</i> B:4 :P1.15. En particular, se usa un plasmido recombinante contenido dicha secuencia bajo el control del promotor triptófano de <i>E. coli</i> y del terminador de la transcripción del fago T4, incluyendo sitios de restricción que permiten la clonación en fase de fragmentos de ADN codificantes para polipéptidos de interés. El procedimiento objeto de la presente invención es aplicable en la industria farmacéutica, para el desarrollo de sistemas de diagnóstico, de preparados vacunales, y en cualquier situación donde sea necesaria la obtención en grandes cantidades de proteínas heterólogas como polipéptidos de fusión en <i>E. coli</i>.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungría	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benín	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumanía
BY	Belarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CF	República Centroafricana	KR	República de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KZ	Kazajistán	SG	Singapur
CH	Suiza	LI	Liechtenstein	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lituania	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CZ	República Checa	LV	Letonia	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finlandia	MN	Mongolia	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón			VN	Viet Nam

SISTEMA DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HETERÓLOGOS COMO PROTEÍNAS
DE FUSIÓN.

Sector Técnico.

La presente invención está relacionada con la rama de la biotecnología y la 5 ingeniería genética, particularmente con la expresión de proteínas heterólogas en hospederos microbianos mediante su fusión, usando la tecnología del ADN recombinante, a péptidos bacterianos.

Técnica Anterior.

La utilidad de la tecnología del ADN recombinante para producir proteínas de 10 interés de cualquier origen en *E. coli* ha sido extensivamente demostrada. Para ello una gran cantidad de vectores han sido desarrollados, aunque nuevas variantes son necesarias debido a que, frecuentemente cada gen a clonar y expresar representa un caso individual (Denhardt, D.T. y Colasanti, J.; *Vectors*, Butterworths, Stoneham, MA, pp. 179-204, 1987 y Lukacovich, T. *et al.*, *Journal* 15 *of Biotechnology*, 13, 243-250, 1990).

La síntesis intracelular ha sido la estrategia más usada para la obtención de polipéptidos heterólogos en *E. coli*, debido a los altos niveles de expresión alcanzables (Goeddel, D.V, *Methods Enzymol.*, 185, 3-7, 1990). Sin embargo, factores tales como la sensibilidad a proteasas del hospedero o toxicidad de la 20 proteína expresada pueden disminuir significativamente dichos niveles, independientemente del uso de secuencias reguladoras de alta eficiencia (Lee, C. A. y Saier, M. H., *J. Bacteriol.*, 153, 685-692; Gwyn, G. W., *Membrane Protein Expression Systems: A User's Guide*, Portland Press, Londres, UK, 29-82).

La clonación en vectores apropiados de secuencias nucleotídicas codificantes 25 para proteínas de interés, en fase con secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos estables en la célula hospedera, da lugar a la expresión de productos híbridos en el citoplasma celular conocidos como proteínas de fusión (Marston, F.A.O., *Biochem. J.* 240, 1-12, 1986). Dichos polipéptidos son generalmente menos sensibles a degradación proteolítica por el hospedero o 30 menos tóxicos debido a la formación de cuerpos de inclusión, lo cual resulta en niveles de expresión superiores a los obtenidos sin el uso del péptido estabilizador (Itakura, K. *et al.*, *Science*, 198, 1056-1063, 1977). Adicionalmente,

esta forma de expresión facilita y abarata los pasos iniciales de la purificación si se dispone de métodos para la renaturalización posterior del producto recombinante (Fischer, B., Sumner, I. y Goodenough, P., Biotechnol. Bioeng., 41, 3-13).

5 Los cuerpos de inclusión son agregados proteicos insolubles que aparecen como cuerpos electrodensos en el citosol durante la expresión de muchas proteínas recombinantes en *E. coli* (Rinas, U. y Bailey, J., Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 609-614). Ellos son el resultado de la interacción entre polipéptidos parcialmente plegados, cuya agregación está termodinámicamente favorecida debido a la exposición en los mismos de residuos hidrofóbicos al solvente (Kiefhaber, T., Rudolph, R. et al., Biotechnology, 9, 825-829). El lento plegamiento en el citosol bacteriano de muchas proteínas eucarióticas, debido a la abundancia de aminoácidos formadores de puentes disulfuro (Cisteína) o formadores de giros beta (Prolina) ha estimulado el uso abundante de las mismas 10 como péptido estabilizador. Ejemplo de lo anterior es el uso con este propósito de polipéptidos con actividad de unión a anticuerpos, provenientes de la globulina de la grasa de la leche humana (HMFG), según la solicitud de patente del PCT No. WO 9207939 A2 920514; de regiones constantes de las inmunoglobulinas, según se describe en la solicitud de patente europea No. EP 0464533 A1 920108; 15 de la angiogenina humana (solicitud de patente europea No. EP 0423641 A2 910424), de la hormona del crecimiento (EP 0429586 A1 910605), la glutatión-S-transferasa (WO 8809372 A1 881201) y de la adenilato quinasa porcina (EP 0423641 A2 910424 y EP 0412526 A2 910213).

20 Sin embargo, el uso de polipéptidos estabilizadores que constituyen una parte significativa de la proteína de fusión tiene algunas desventajas si la anterior es un candidato vacunal, pues la presencia de secuencias foráneas puede alterar el orden natural de los epitopos de células B y T (Denton, G., Hudecz, F., Kajtár, J. et al., Peptide Research, 7, 258-264) o el procesamiento de las mismas por las 25 células presentadoras de antígeno (Del Val, M., Schlicht, H., Ruppert, T., et al, Cell, 66, 1145-1153), pudiendo incluso llegar a afectar seriamente la inmunogenicidad de la misma por el fenómeno de supresión epitopo-específica (Etlinger, H., Immunol. Today, 13, 52-55).

Es debido al fenómeno anterior que se ha tratado de definir, en algunos casos, fragmentos pequeños que aún estabilicen la expresión. Por ejemplo, la solicitud de patente alemana No 35 41 856 A1 (Hoechst AG) reporta la posibilidad de utilizar un péptido estabilizador conformado por al menos los primeros 95 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína humana Interleucina-2 (IL-2) para obtener proteínas de fusión de forma insoluble sintetizadas en *E. coli*. De igual forma en las solicitudes de patente europeas No. 0 416 673 A2 y No. 229 998 de la misma firma se usa un péptido estabilizador consistente en los primeros 58 ó 38 aminoácidos de dicha proteína, respectivamente. También se usan los primeros 58 residuos de la IL-2 en la patente europea No. 416 673 B1, y una estrategia similar se sigue en el caso del uso con este propósito de fragmentos N-terminales de la seroalbúmina humana (solicitud de patente europea No. EP 0423641 A1 920212); del péptido III activador del tejido conectivo (WO 90136647 A1 901115) y de fragmentos de la kallikreína humana (EP 0381433 A1 900808). Estas invenciones dan solución al problema anterior, pero los polipéptidos de fusión obtenidos no pueden incluirse en preparados vacunales para uso en humanos, debido a la posibilidad de inducción de enfermedades autoinmunes por la presencia en ellos de secuencias homólogas o idénticas a proteínas humanas.

La alternativa de utilizar polipéptidos estabilizadores de origen bacteriano --y por lo tanto, sin reactividad cruzada con antígenos de origen humano-- para la expresión intracelular, también ha sido explorada con éxito. Una de las proteínas más usadas con este fin ha sido la β -galactosidasa de *E. coli* (Itakura, K. et al., Science, 198, 1056-1063, 1977) o porciones de ella (solicitud de patente alemana No. EP 0235754 A2 870909, de la firma Hoechst AG). La principal desventaja de este sistema es el gran tamaño de esta proteína, que trae como consecuencia que el péptido deseado sólo represente una pequeña porción de la proteína híbrida total (Flores, N. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 267-271, 1986; Goeddel, D.V. et al., P.N.A.S. USA, 76, 106-110). Idénticos problemas ha presentado el uso del fragmento C de la toxina del tétanos y la exotoxina de *Pseudomonas* sp. (solicitudes de patentes Nos. WO 9403615 A1 940217 y EP 0369316 A2 900523). Una variante de expresión muy promisoria es el uso de fusiones con la

5 tiorredoxina de *E. coli* (solicitud de patente No. WO 9402502 A1 940203), que usa la propiedad de la misma de ser liberada de la célula por estrés osmótico (Elyagoubi, A., Kohiyama, M., Richarme, G., J. Bacteriol., 176, 7074-7078) para facilitar la purificación. Sin embargo, este esquema no es funcional para la obtención de cuerpos de inclusión, pues los mismos no son liberados mediante este procedimiento.

10 Muchos de estos problemas han sido solucionados con el diseño de proteínas de fusión modulares. En éstas, el péptido estabilizador está separado de la proteína de interés por un espaciador que permite el plegamiento independiente de ambos, y cuya secuencia aminoacídica le hace susceptible al ataque de endopeptidasas específicas. Si existe un ligando que reconoce el estabilizador escogido, es posible entonces purificar el polipéptido de fusión mediante 15 cromatografía de afinidad y finalmente separarlo del estabilizador mediante el tratamiento con determinadas proteasas (Cress, D., Shultz, J. y Breitlow, S., Promega Notes, 42, 2-7). Una ventaja adicional es la posibilidad de aprovechar esta interacción molecular para el seguimiento de pasos intermedios de la purificación sin la necesidad de disponer de anticuerpos para cada proteína a expresar. Un ejemplo bien conocido de lo anterior es el uso de la afinidad del aminoácido histidina (Hys) con algunos metales como el níquel (Ni) y el zinc (Zn) 20 en sistemas compuestos por un estabilizador con 6 Hys en tandem y una matriz de afinidad de quelatos de níquel, según lo descrito en la solicitud de patente No. WO 9115589 A1 911017 de The Upjohn Co. A pesar de todo esto, este tipo de sistema de expresión no funciona en todos los casos, pues entre otras razones la proteína de interés puede tener sitios de corte para la proteasa escogida, o 25 plegarse de forma que el espaciador no esté accesible al solvente (Uhlen, M. y Moks, T., Meth. Enzymol. 185, 129-140; Cress, D., Shultz, J. y Breitlow, S., Promega Notes, 42, 2-7), interferir la unión entre el estabilizador y la matriz de afinidad (New England Biolabs, The NEB Transcript, 3, 14), o simplemente requerir, para su purificación, condiciones que afecten su actividad biológica. Por 30 esta razón es deseable disponer de distintas variantes, pues cada proteína a expresar de esta forma puede representar un caso particular. Se han desarrollado con esta finalidad, entre otros, péptidos estabilizadores basados en

la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MalE), los cuales tienen afinidad por resinas de amilosa (solicitud de patente EP 0426787 A1 910515); en las enzimas cloranfenicol acetil transferasa (solicitud de patente No. EP 0131363 A1 850116) o en la glutatión-S-transferasa (solicitud de patente No. EP 0293249 A1 88130, 5 de la Amrad Corp., Ltd.) purificable con matrices del sustrato inmovilizado; en la proteína A de *Staphylococcus aureus*, según la solicitud de patente No. WO 9109946 A1 910711; y en la subunidad de 12.5 kDa del complejo de la transcarboxilasa de *Propriionibacterium shermanii*, la cual es biotinilada *in vivo* y permite la purificación basada en la afinidad de la biotina por la avidina (Cress, 10 D., Shultz, J. y Breitlow, S., Promega Notes, 42, 2-7, solicitudes de patentes No. EP 0472658 A1 920304 ó WO 9014431 A1 901129).

De particular interés resulta el método descrito en la solicitud patente EP 0472658 A1 920304 ó WO 9014431 A1 901129, desarrollada por la Biotechnology Research and Development Corporation, conjuntamente con la 15 Universidad de Illinois, USA. En ella se describe un sistema de expresión que usa el dominio de unión al ácido lipoico de la dihidrolipoamida acetil transferasa (EC 2.3.1.12), también conocida como la subunidad E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa de *E. coli*. Este dominio es modificado postraduccionalmente *in vivo* mediante la adición de una molécula de ácido lipoico al nitrógeno e de una 20 de sus lisinas (Guest, J.R., Angier, J.S. y Russell, G.C., Ann. N.Y. Acad. Sci., 573, 76-99), lo que es aprovechado para la purificación e identificación de proteínas fusionadas al mismo mediante el uso de un anticuerpo que reconoce sólo dominios lipoilados.

Este método, sin embargo, adolece de un número de inconvenientes. En 25 primer lugar, es conocido que la sobreexpresión de proteínas conteniendo dominios de unión al ácido lipoico sobrepasa la capacidad de lipoilación celular, produciéndose como consecuencia dominios no lipoilados (Miles, J.S. y Guest, J.R., Biochem. J., 245, 869-874; Ali, S.T. y Guest, J.R., Biochem. J., 271, 139-145) u octanoilados (Ali, S.T., Moir, A.J., Ashton, P.R. *et al.* Mol. Microbiol., 4, 30 943-950; Dardel, F., Packman, L.C. y Perham, R.N., FEBS Lett. 295, 13-16), lo que puede disminuir el rendimiento durante la purificación por inmunoafinidad. En segundo lugar, existe una serie de enfermedades de origen supuestamente

autoinmune que tienen como factor común la presencia de anticuerpos que reconocen específicamente al ácido lipoico en el contexto de estos dominios. Entre ellas están la cirrosis biliar primaria, una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación y obstrucción progresiva de los conductos biliares intrahepáticos (Tuailon, N., Andre, C., Briand, J.P. *et al.*, *J. Immunol.*, 148, 445-450); y la hepatitis provocada por el halotano, un anestésico de amplio uso que derivatiza algunas proteínas mediante la formación de trifluoroacetil lisina (Gut, J., Christen, U., Frey, N. *et al.*, *Toxicology*, 97, 199-224). El suero de los pacientes de esta enfermedad reconoce dichos complejos, cuya estructura molecular es mimetizada por el ácido lipoico en el contexto de las dihidrolipoamida acetil transferasas (Gut, J., Christen, U., Frey, N. *et al.*, *Toxicology*, 97, 199-224). Por esta razón es deseable evitar la presencia del ácido lipoico en dichos péptidos si las proteínas de fusión que los contienen constituyen candidatos vacunales para uso en humanos.

15 **Divulgación de la Invención.**

Es objeto de la presente invención un procedimiento para la expresión a altos niveles de proteínas heterólogas como polipéptidos de fusión en *E. coli*; el cual está basado en el uso de una secuencia estabilizadora derivada de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (solicitud de 20 Patente Europea No. 0 474 313 A2) que confiere a los mismos la capacidad de expresarse como cuerpos de inclusión. Dicha secuencia, aunque presenta homología con parte del dominio de unión al ácido lipoico de las dihidrolipoamida acetil transferasas, ha sido manipulada genéticamente para eliminar la 25 posibilidad de modificación por el mismo y presenta la ventaja de ser poco inmunogénica. Este procedimiento también comprende el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente el mencionado estabilizador, permitiendo la inmunodetección de cualquier proteína fusionada al mismo.

Particularmente, en la presente invención se usa un plasmidio recombinante como vector de expresión, el cual porta dicha secuencia bajo el control del 30 promotor triptófano (ptrip) de *E. coli*, seguida por sitios de restricción XbaI, EcoRV y BamHI que permiten la clonación en fase de fragmentos de ADN codificantes para polipéptidos de interés. Este vector consta además del

terminador de la transcripción del gen 32 del bacteriófago T4, y de un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección.

Este procedimiento hace posible además la inclusión del polipéptido de fusión obtenido en preparados vacunales destinados al uso en humanos; y la naturaleza 5 del péptido estabilizador empleado permite la generación de una respuesta inmune eficaz contra la proteína foránea o péptido multiepitópico unido al mismo.

Constituye una novedad de la presente invención la manipulación genética y el uso de un fragmento estabilizador homólogo a parte del dominio de unión al 10 ácido lipoico de las dihidrolipoamida acetil transferasas para la producción de proteínas de fusión por vía recombinante en *E. coli*. Particularmente, constituyen novedades de la presente invención el uso con el anterior objetivo de un péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (solicitud de Patente Europea No. 0 474 313 A2), y su 15 detección mediante un anticuerpo monoclonal murino que lo reconoce específicamente.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

EJEMPLO 1:

El antígeno LpdA de *N. meningitidis* (P64k, LpdA) es una proteína de 594 20 aminoácidos que pertenece a la familia de las dihidrolipoamida deshidrogenasas (EC 1.8.1.4) y específicamente, a un nuevo subgrupo dentro de las mismas caracterizado por poseer un dominio de unión al ácido lipoico, análogo al presente en las dihidrolipoamida acetil transferasas, en su porción aminoterminal (Kruger, N., Oppermann, F. B., Lorenzl, H. y Steinbüchel, A., J. Bacteriol., 176, 3614-3630, 1994; Hein, S. y Steinbüchel, A., J. Bacteriol., 176, 4394-4408, 1994). La proteína LpdA ha sido clonada y sobreexpresada en *E. coli*, 25 con la adición de 5 aminoácidos (MLDKR) en su extremo aminoterminal (solicitud de Patente Europea No. 0 474 313 A2; Figura 1). Aunque las denominaciones LpdA y P64k son equivalentes, se usará el nombre P64k para referirse a la 30 proteína recombinante.

Para determinar la inmunogenicidad de diferentes fragmentos de dicho antígeno con el objetivo de analizar la posibilidad de usar los menos inmunogénicos como péptido estabilizador, se localizaron los epitopos para células B presentes en el mismo mediante la evaluación de la reactividad de un suero polyclonal anti-P64k contra péptidos sintéticos.

Con este objetivo se purificó la P64k (solicitud de Patente Europea No. 0 474 313 A2) mediante cromatografía de hidrofobicidad en Butyl-TSK y gel filtración; y se desnaturizó precipitándola con ácido tricloroacético (TCA), neutralizando con NaOH y equilibrando en tampón fosfato por cromatografía en gel filtración. Esta preparación se usó para inmunizar 30 ratones Balb/c con dosis de 20 mg adyuvadas con 2 mg de hidróxido de aluminio por vía subcutánea, a los 0, 7 y 21 días; y a los 28 días se hizo la extracción final. Los sueros obtenidos se combinaron, y la mezcla resultante se alicuotó y se guardó a -20°C.

A continuación se sintetizaron 59 péptidos de 20 aminoácidos (a.a.) que cubren toda la secuencia de la proteína recombinante y se sobreapan por 10 a.a., usando un juego de reactivos para la síntesis en fase sólida (Multipin Peptide Synthesis System, Chiron Mimotope Pty., Ltd., USA) en formato de placas de 96 pocillos y siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos se numeraron consecutivamente a partir del extremo aminoterminal de la proteína. La reactividad del suero antiP64k contra estos péptidos se determinó usando una dilución 1:2000 del mismo, y el formato de inmunoensayo usado fue el recomendado por el fabricante del juego de reactivos anterior.

Los resultados pueden apreciarse en la Figura 2, en la cual se representan los valores de absorbancia para cada péptido. Es evidente que los primeros 110 aminoácidos (representados por los péptidos 1 al 11) conforman un segmento pobemente inmunogénico a pesar de la desnaturización del inmunógeno, que puede incluso exponer epitopos crípticos. Este segmento comprende en lo fundamental el dominio de unión al ácido lipoico y el espaciador rico en Prolina y Alanina que lo conecta al resto de la proteína. El resultado anterior demuestra que el mismo (o fragmentos de derivados de él) pueden utilizarse ventajosamente como péptidos estabilizadores, debido a la poca influencia que tendría sobre la inmunogenicidad de los polipéptidos a los que se fusione. Esta ventaja es

especialmente importante si el polipéptido de fusión constituye un candidato vacunal.

EJEMPLO 2:

Para la expresión de diferentes proteínas heterólogas en *E. coli* mediante su fusión al dominio de unión al ácido lipoico del antígeno P64k de *N. meningitidis* B:4:P1.15 se construyó el vector de expresión pM-83, en el cual se introdujo la secuencia codificante para un péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos de dicha proteína (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 1). Esta secuencia se clonó bajo el control del promotor triptófano de *E. coli*, presentando además este vector el terminador del bacteriófago T4 como señal de terminación de la transcripción y el gen de resistencia a la ampicilina como marcador de selección.

Para su construcción se amplificó primeramente el estabilizador usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Randall, K. et al., *Science*, 42394, 15 487-491, 1988) a partir del plasmidio pM-6, el cual porta la secuencia nucleotídica codificante para el antígeno P64k (solicitud de Patente Europea No. 0 474 313 A2, Figura 1). Con este fin se usaron los oligonucleótidos cebadores 1573 y 1575, los cuales introducen sitios de restricción NcoI y XbaI en el fragmento de ADN amplificado que corresponden con los extremos amino- y 20 carboxilo-terminal del estabilizador codificado por el mismo:

NcoI

1573: 5' TTCCATGGTAGATAAAAGAATGGCTTAG 3' (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 2)

XbaI

1575: 5' TTTCTAGATCCAAAGTAATCAGGGTATCG 3' (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 3)

La secuencia aminoacídica codificada por el estabilizador resultante se muestra en la Figura 3 (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 6). La introducción del sitio de restricción NcoI cambia la Leucina 2 por una Valina; y el cebador 1575 elimina la secuencia ETD (posición 45-47), introduciendo en su lugar la secuencia DLE. De esta forma la Lisina unidora del ácido lipoico (posición 48) no forma parte del estabilizador, y la vecindad de la misma, que es altamente conservada en estos dominios (Russell, G.C., Guest, J.R., *Biochim.*

Biophys. Acta, 1076, 225-232, 1991) es alterada. Todo esto garantiza la eliminación de las posibilidades de lipoilación postraduccional de las proteínas de fusión que lo contengan, y de generación durante la inmunización con las mismas de autoanticuerpos de parecida especificidad a los presentes en los 5 pacientes de cirrosis biliar primaria (Tuailon, N., Andre, C., Briand, J.P. *et al.*, J. Immunol., 148, 445-450).

El plasmidio pM-83 fue construido mediante el clonaje de este fragmento (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 5) previamente digerido XbaI/NcoI en el plasmidio pILM-29 (Guillén, G., Leal, M., Alvarez, A. *et al.*, Acta Biotecnológica, 10 15, 97-106, 1995). El pILM29 contiene el gen para la proteína Opc (5c) de *N. meningitidis* fusionado a un péptido estabilizador consistente en los primeros 58 aminoácidos de la IL-2 humana, de forma que dicha clonación remueve el fragmento de IL-2 y fusiona la Opc al estabilizador de la P64k (Figura 4). Del 15 plasmidio resultante, denominado pM-80, se suprimió a su vez el gen *opc* usando las enzimas XbaI y BamHI y en su lugar se clonó un adaptador formado por la hibridación de los oligonucleótidos 1576 y 1577, lo que introduce sitios de restricción XbaI, EcoRV y BamHI en el extremo 3' del fragmento estabilizador:

1576 5' CTAGATTGATATCAG 3' (NO. IDENTIFICACIÓN DE
SECUENCIA: 7)
20 1577 3' TAAACTATAGTCCTAG 5' (NO. IDENTIFICACIÓN DE
SECUENCIA: 8)

Este plasmidio se denominó pM-83 (Figura 4). La inserción de todos los fragmentos de ADN y oligonucleótidos, así como el mantenimiento del marco correcto de lectura, se verificaron mediante secuenciación del ADN según Sanger, 25 F. *et al.*, PNAS, USA, 74: 5463-5467, 1977.

EJEMPLO 3:

Es importante que el estabilizador no contenga regiones de alta homología con proteínas humanas si la proteína de fusión resultante es un candidato vacunal. La determinación de la similitud del péptido estabilizador del pM-83 30 (EJEMPLO 2) con proteínas humanas se realizó mediante una búsqueda de homología en las bases de datos EMBL Data Library v.38 (Rice, C.M., Fuchs, R., Higgins, D.G. *et al.*, Nucl. Acids Res. 21, 2967-2971, 1993) de secuencias

nucleotídicas, y SWISS-PROT v.38 (Bairoch, A. y Boeckmann, B., Nucl. Acids Res. 21, 3093-3096, 1993) de secuencias aminoacídicas; ambas versiones de marzo de 1994. Para esta búsqueda se usaron dos de los programas BLAST (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990): BLASTP, que compara una secuencia de aminoácidos contra una base de secuencias de proteínas (en este caso SWISS-PROT) y TBLASTN, que compara una secuencia de aminoácidos contra todas las traducciones en ambas direcciones y en todos los marcos de lectura de una base de secuencias de nucleótidos, como en este caso la EMBL Data Library; en 10 ambos casos se usó una matriz de valorización PAM120 [Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. y Orcutt, B.B., en: Dayhoff, M.O. (de.), *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5, supl.3, 345-352, Natn. Biomed. Res. Found., Washington, 1978].

El resultado puede apreciarse en la Figura 5 y en la Figura 6, las cuales 15 muestran las hojas de resultados respectivas del BLASTP y el TBLASTN (se han omitido secuencias homólogas de procariotes o eucariotes inferiores para mayor claridad). Es obvio que ninguna proteína humana o de mamíferos presenta similitudes significativas con el estabilizador derivado de la P64k; pues las 20 homologías detectadas por ambos algoritmos (en las piruvato quinasas humanas y de rata; y el extremo C-terminal de las mucinas humanas y caninas) presentan una altísima probabilidad de ocurrencia casual (como punto de comparación, la misma probabilidad, para el caso de la dihidrolipoamida acetil transferasa de *Azotobacter vinelandii*, es de 3.7×10^{-5}).

De todo lo anterior puede concluirse que el uso de dicho estabilizador en 25 candidatos vacunales es absolutamente seguro.

EJEMPLO 4:

La capacidad del estabilizador presente en el pM-83 de permitir la síntesis intracelular a altos niveles y en forma de cuerpos de inclusión se evaluó comparando la expresión de varias proteínas fusionadas a los primeros 22 o 58 30 aminoácidos de la Interleucina-2 humana (IL-2), que es un péptido de fusión muy usado con este fin, o fusionadas a los primeros 47 a.a. del antígeno P64k modificado según se describe en el EJEMPLO 2.

Para ello se clonaron en los vectores pFP15 (hIL2-58; Patente Europea No. 416 673 B1) o pM-83 (P64k-47) los genes codificantes para la proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 PorA y Opc; y en los vectores pISL31 (hIL2-22, Castellanos-Serra, L.R., Hardy, E., Ubieta, R., *et al.*, Manuscrito remitido) o 5 pM-83, los genes codificantes para un polipéptido multiepitópico (PME) que incluye regiones inmunogénicas de varios aislamientos del Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH. Los plasmidos de expresión resultantes son: pILM-28 (IL2-58 + PorA; Guillén, G., Alvarez, A., León, L., *et al.*, 494-498 en: Conde-González, C.J., Morse, S., Rice, P. *et al.* (eds.), *Pathobiology and 10 Immunobiology of Neisseriaceae*, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México, 1994), pM-82 (P64k-47 + PorA; Niebla, O., Alvarez, A., González, S. *et al.*, 85-86 en: Evans, J.S., Yost, S.E., Maiden, M.C.J. *et al.* (eds.), *Neisseria 94: Proceedings of the IX International Pathogenic Neisseria Conference*, Winchester, England, 1994), pILM-29 (IL2-58 + Opc; Guillén, G., 15 Leal, M., Alvarez, A. *et al.*, *Acta Biotecnologica*, 15, 97-106, 1995), pM-80 (EJEMPLO 2, Figura 4), pTAB4 (IL2-22 + PME) y pTAB9 (P64k-47 + PME).

Las proteínas TAB4 y TAB9 son polipéptidos multiepitópicos (PME) que incluyen varias copias de la parte central de la región variable 3 (V3) de la proteína gp120 del VIH-1. Para la construcción de estos PME fueron 20 seleccionados los 15 aminoácidos centrales de la región V3 de los aislamientos siguientes:

-LR150: SRGIRIGPGRAILAT (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 9
-JY1: RQSTPIGLGQALYTT (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 10
-RF: RKSITKGPGRVYAT (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 11)
-MN: RKRIHIGPGRFYTT (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 12
-BRVA: RKRITMGPGRVYYTT (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 13
-IIIB: SIRIQRGPGRAFVTI (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 14)

Estas regiones están unidas entre sí por un péptido espaciador de cinco aminoácidos, de secuencia AGGGA (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 17).

Para su obtención, la secuencia de ADN codificante para los epitopos V3 25 enlazados por el péptido espaciador se obtuvo por síntesis química (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 21) y se clonó bajo el control del promotor

triptófano, fusionada a los primeros 22 aminoácidos de la IL-2 humana (Figura 7). Del plasmidio resultante, llamado pTAB3, se extrajo un fragmento contenido el gen para el PME, el promotor triptófano y el terminador del fago T4 mediante digestión con las enzimas *Scal* y *HindIII*, y se clonó en pUC19 5 (Yanisch-Perron, C. et al., 1985, *Gene* 33, 103-119) para obtener el pTAB4 (Figura 7). Finalmente, el pTAB9 se construyó eliminando la secuencia codificante para el estabilizador derivado de la IL-2 humana por digestión con las enzimas *Ncol* y *XbaI*, y clonando en su lugar un fragmento codificante para los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k obtenido por Reacción en Cadena de 10 la Polimerasa (PCR), como se describe en el EJEMPLO 2. La secuencia del PME resultante se muestra en la Figura 8, y su organización en la Figura 9 A.

Las cepas hospederas de *E. coli* K-12 usadas para todos estos plasmidos fueron la W3110 (Hill, C.W., y Hamish, B.W. *Proc.Natl. Acad. Sci.*, 78, 7069, 1981; Jensen, K. F., *J.Bacteriol.*, 175, 3401-3407, 1993) para pILM-28, pILM-29, 15 pM-80 y pM-82; y la W3110 *trpA905*, para pTAB4 y pTAB9. La expresión se logró en todos los casos inoculando un cultivo de 5 mL de medio LB (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York, USA) con ampicilina (Ap) a 50 µg/mL y triptófano (W) a 100 µg/mL, el cual se creció por 12 h a 37°C. Dicho cultivo se 20 usó para inocular cultivos de 50 mL de LB-Ap (pTAB4 y pTAB9) o de un medio definido compuesto por sales M9 (Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972, New York, USA), glucosa al 1%, hidrolizado de caseína al 1%, CaCl_2 0.1 mM, MgCl_2 1mM y Ap a 50 ug/mL (pILM-28, pILM-29, pM-80, pM-82), los cuales se crecieron 12 h a 37°C y 250 25 r.p.m. Al cabo de este tiempo se tomaron muestras de proteínas totales y se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, Laemmli, U.K., *Nature*, 277, 680, 1970) y tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250; analizándose el porcentaje de expresión con un densíómetro de laser Bromma-LKB. Su localización celular se determinó lisando las células 30 mediante tratamiento combinado con lisozima y ultrasonido, tras lo cual se separaron las proteínas solubles de las insolubles por centrifugación. La insolubilidad de la proteína se usó como criterio para asumir su expresión como

cuerpos de inclusión, pues otras condiciones bajo las cuales puede exhibir dicho comportamiento (asociación a membranas o al peptidoglucano) son improbables en este caso.

Un resumen de los resultados puede apreciarse en la Figura 10 A. En todos 5 los casos la expresión bajo el estabilizador derivado de la P64k es comparable a la expresión fusionada a péptidos de la IL-2 en cuanto a la relación de proteína heteróloga: proteína celular total (Ver Figura 10 B para el caso del PME); lo que confirma la capacidad del pM-83 para ser usado como vector para la expresión de péptidos de fusión. Es de señalar que estos polipéptidos son de difícil 10 expresión en *E. coli* si no se fusionan, ya sea por su pequeño tamaño y sensibilidad a proteasas del hospedero, como el PME, o por su toxicidad en el caso de la proteína PorA y las porinas bacterianas en general (Carbonetti, N.H. y Sparling, P.F.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 9084-9088). En todos los casos el producto se obtuvo como cuerpos de inclusión, como se ejemplifica para el 15 pTAB9 (Figura 10 C).

En conclusión es posible plantear que el uso del estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k de *N. meningitidis* (P64k-47) resulta en una eficiencia de expresión de proteínas heterólogas como cuerpos de inclusión comparable a la de otros sistemas (solicitudes de patentes europeas No. 20 0 416 673 A2 y No. 229 998, Hoechst AG; patente europea No. 0 416 673 B1; Castellanos-Serra, L.R., Hardy, E., Ubieta, R., et al., Manuscrito remitido), con el beneficio adicional de poder usarse el producto directamente (i.e., sin separarlo del estabilizador) debido a la ausencia de homología significativa con antígenos de procedencia humana.

25 **EJEMPLO 5:**

La disponibilidad de un ligando que reconozca específicamente el estabilizador (Ej. un anticuerpo, un cofactor enzimático, etc.) es una característica deseable en cualquier sistema de expresión de proteínas recombinantes. Esto se debe a que lo anterior puede permitir, por ejemplo, el 30 diseño de esquemas eficientes de purificación por afinidad si se inmoviliza dicho ligando en una resina cromatográfica; e incluso -en el caso de los anticuerpos- el seguimiento de los pasos intermedios de la purificación

mediante técnicas inmunológicas, independientemente de la identidad de la proteína heteróloga expresada.

Dicho objetivo se alcanzó inmunizando ratones con la proteína TAB13 (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 20) con la finalidad de obtener anticuerpos monoclonales (MAb) contra su estabilizador. TAB13 es un PME derivado del TAB9 que se diferencia de este por la presencia de 2 regiones V3 consenso adicionales (Figura 9 B):

-C6: TSITIGPGQVFYRTG (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 15)
-C8: QRRTSIGQQQALYTT (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 16)

Este PME fue expresado (EJEMPLO 4) y purificado (EJEMPLO 6) de manera análoga a la descrita para los TAB4 y TAB9.

A continuación se inmunizaron ratones Balb/c por vía subcutánea con 3 dosis de 20 µg de TAB13 adyuvado en Al(OH)₃ con 15 días de intervalo; y una reactivación por vía intraperitoneal con 20 µg de TAB13 en solución tampón fosfato, 20 días después de la última dosis. Los esplecnocitos de este animal se fundieron con el mieloma X63 Ag8 653 y los hibridomas resultantes se aislaron y pesquisaron según métodos establecidos (Gavilondo, J.V. (ed.), Anticuerpos Monoclonales: Teoría y Práctica, Elfos Scientiae, 1995, La Habana, Cuba).

La reactividad de los anticuerpos secretados por los hibridomas aislados se evaluó mediante ELISA, recubriendo con el PME TAB13, la proteína P64k o péptidos sintéticos representando las diferentes regiones V3 presentes en TAB13. En total se obtuvieron 18 clones positivos, uno de los cuales, el denominado 448/30/7, reconoce tanto a TAB13 como a la P64k, pero a ninguno de los péptidos de la gp120.

La especificidad de este MAb por el péptido estabilizador del pM-83 y la posibilidad de su uso para la detección inmunológica de proteínas que lo contengan se determinó mediante Western blotting, usando como muestras diferentes proteínas heterólogas fusionadas al estabilizador derivado de la P64k (P64k-47), o la misma proteína fusionada ya al P64k-47 o a los primeros 58 aminoácidos de la IL-2 (IL2-58). Para esto se transformó la cepa MM294 de *E. coli* (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA) con los

siguientes plasmidios: pILM-28 (IL2-58 + *porA*), pM-82 (P64k-47 + *porA*), pTAB13 (P64k-47 + PME), pM-6 (P64k) y pFP15 (IL-2). También se usó el plasmidio de expresión pM-134, el cual contiene los primeros 120 aminoácidos de la P64k (los cuales comprenden el sitio de unión al ácido lipoico) bajo 5 idénticas señales regulatorias a los anteriores. Este segmento se amplificó por RCP usando los cebadores Nos. 1573 (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 2) y 2192 (NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 4); se digirió con las enzimas NcoI y BamHI, y se clonó en el plasmidio pFP15 (Ver EJEMPLO 4) digerido idénticamente. La expresión de estos transformantes se logró en las condiciones 10 de crecimiento especificadas en el EJEMPLO 4 para el pTAB4 y el pTAB9.

En la Figura 11 se representan los resultados. Como puede apreciarse, el MAb 448/30/7 reconoce un epitopo probablemente lineal en el estabilizador P64k-47, debido a su reactividad con las muestras de los plasmidios pM-6, pM-82, pTAB13 y pM134 a pesar de ser todas estas proteínas antigenicamente disímiles. Este experimento demuestra que en ningún caso esta reactividad se 15 debe a la proteína fusionada al estabilizador (ver Ej. los plasmidios pILM-28 y pM-82: ambos portan el gen *porA* bajo diferentes estabilizadores) y evidencia la especificidad de reconocimiento del MAb.

En conclusión, el sistema de expresión conformado por el estabilizador P64k- 20 47, los plasmidios que lo contienen y el MAb 448/30/7 permite la síntesis eficiente y en forma de cuerpos de inclusión de una gran variedad de proteínas, y su detección sin la disponibilidad previa de sondas inmunológicas contra cada polipéptido a expresar.

EJEMPLO 6:

25 La ausencia de efectos deletéreos sobre la respuesta inmune contra el polipéptido fusionado al estabilizador es un factor importante a tener en cuenta al seleccionar un sistema de expresión para candidatos vacunales. Una de las ventajas del sistema de expresión basado en el estabilizador P64k-47 es precisamente su baja inmunogenicidad (EJEMPLO 1), la cual garantiza lo anterior. No obstante, se evaluó cualitativamente la influencia del estabilizador 30 P64k-47 en la respuesta inmune contra la proteína fusionada mediante la

comparación de la respuesta de anticuerpos contra los diferentes péptidos del V3 presentes en los PME TAB4 (IL2-22) y TAB9 (P64k-47).

Para la expresión y la purificación de TAB4 y TAB9, se obtuvo biomasa de las cepas W3110 *trpA905* + pTAB4 y W3110 *trpA905* + pTAB9 como se describe en el

5 EJEMPLO 4. Esta biomasa se rompió combinando el tratamiento con lisozima y con ultrasonido en presencia de fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) y el detergente no iónico Tritón-X-100; se obtuvieron los cuerpos de inclusión por centrifugación diferencial, y se purificaron parcialmente y solubilizaron los PME mediante dos ciclos sucesivos de lavados de los cuerpos de inclusión con agentes
10 caotrópicos y detergentes (TAB4: 1. Urea 4 M + Tritón-X-100 1%, 2. Urea 8 M. TAB9: 1. Urea 8 M + Tritón-X-100 1%, 2. cloruro de guanidinio 6 M). Los sobrenadantes obtenidos se purificaron finalmente usando un gradiente de 20 a 80% de acetonitrilo en una columna C4 VYDAC de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), lográndose aproximadamente un 90% de pureza.

15 Las proteínas recombinantes purificadas se adyuvaron en gel de hidróxido de aluminio usando una relación de 60 mg de adyuvante por mg de proteína, y con las mismas se inmunizaron 5 grupos de conejos por vía subcutánea con 200 µg/dosis. La respuesta se evaluó por ELISA, usando placas de poliestireno de 96 pocillos (High binding, Costar, USA), y recubriendo bien con el PME usado para
20 la inmunización, o con péptidos correspondientes a cada una de las regiones V3 presentes en el mismo. Los títulos se calcularon como la máxima dilución de cada suero con un valor de absorbancia mayor al doble del de una mezcla de sueros preinmunes; todos los sueros se analizaron por duplicado.

25 Los valores obtenidos (Figura 12) muestran que los títulos contra las regiones V3 son similares entre las variantes IL2-22 + PME (TAB4) y P64K-47 + PME (TAB9). Aunque la frecuencia de reconocimiento de los péptidos es ligeramente mayor para el TAB9, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En conclusión, la inmunogenicidad de la proteína heteróloga es afectada por el estabilizador P64k-47 de forma mínima, y comparable a otros sistemas
30 de expresión corrientemente en uso.

Breve descripción de las Figuras:

Figura 1: Secuencia nucleotídica del gen P64k. Se muestra en itálicas la secuencia adicionada en el plasmidio pM-6 (solicitud de Patente Europea No. 0 5 474 313 A2), ausente originalmente en el gen *lpdA*.

Figura 2: Reactividad del suero policlonal de ratón contra péptidos de la P64k. Se escogió un valor mínimo de 0.4 unidades de densidad óptica para considerar el resultado como positivo.

Figura 3: Secuencia aminoacídica del estabilizador, deducida de la secuencia 10 de ADN amplificada por RCP a partir del plasmidio pM-6. Las secuencias subrayadas corresponden a los oligonucleótidos cebadores.

Figura 4: Estrategia de construcción del plásmido pM-83.

Figura 5: Resultados de la búsqueda de homología entre las secuencias del estabilizador ('Query') y las presentes en la base SWISS-PROT ('Sbjct'), usando 15 el programa BLASTP. Sólo se muestran las entradas correspondientes a proteínas humanas o de mamíferos. P(N) representa la probabilidad de encontrar N alineamientos iguales en una base compuesta de secuencias aleatorias; la significancia de la homología disminuye con el valor de P(N). Residuos idénticos se representan con su código de una letra; las sustituciones 20 conservativas con un '+', y las diferencias no se señalan.

Figura 6: Resultados de la búsqueda de homología entre las secuencias del estabilizador ('Query') y todas las posibles traducciones de las secuencias de la EMBL Data Library ('Sbjct'), usando el programa TBLASTN. Sólo se muestran las entradas correspondientes a proteínas humanas o de mamíferos. P(N) 25 representa la probabilidad de encontrar N alineamientos iguales en una base compuesta de secuencias aleatorias; la significancia de la homología disminuye con el valor de P(N). Residuos idénticos se representan con su código de una letra; las sustituciones conservativas con un '+', y las diferencias no se señalan.

Figura 7: Estrategia de construcción de pTAB4 y pTAB9.

Figura 8: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del PME TAB9.

Figura 9: A: Estructura general de los PME TAB4 y TAB9. B: Estructura general del PME TAB13.

Figura 10: Comparación de la expresión de los genes *porA*, *opc* y del PME bajo estabilizadores derivados de la IL-2 humana o de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k.

A: Tabla comparativa. hIL2-58 se refiere a los primeros 58 aminoácidos de la IL-2 humana, hIL2-22 a los primeros 22, y P64k-47 al estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k.

B: Análisis comparado por SDS-PAGE de la expresión del PME en los plasmidios TAB4 y TAB9. Carril A: Marcadores de peso molecular; B: Proteínas totales de la cepa W3110 *trpA905*; C: Proteínas totales de W3110 *trpA905* + pTAB4; D: TAB4 purificada; E: Proteínas totales de W3110 *trpA905* + pTAB9; F: TAB9 purificada.

C: Expresión de TAB9 en cuerpos de inclusión. A: Proteínas solubles de la muestra. B: Proteínas insolubles o de membrana.

Figura 11: 'Western blotting' usando el MAb 448/30/7 con muestras de proteínas totales de *E. coli* MM294 transformada con: 1: Control negativo, 2: pM-6 (P64k), 3: pM-82 (P64k-47 + *porA*), 4: pTAB13 (P64k-47 + PME), 5: pFP15 (IL-2), 6: pM-134 (P64k-120), 7: pILM-28 (IL2-58 + *porA*). A la izquierda se representa la migración de los patrones de peso molecular.

Figura 12: Recíproco del valor del título por ELISA de los conejos inmunizados con TAB4 y TAB9. MG: Media geométrica del recíproco de los títulos anti V3; R: Porcentaje de reactividad con los péptidos V3.

LISTA DE SECUENCIAS

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 1

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 47 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Primeros 47 aminoácidos de la proteína recombinante P64k de *N. meningitidis*.

MLDKRMALVELKVPDIGHENVDIIAVEVNVDIATVDDTLITLETD

44

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 2

TIPO DE SECUENCIA: Nucleotídica

LONGITUD: 29 bases

TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido sintético

PROPIEDADES: Cebador 5' No. 1573 para amplificación por RCP de los primeros 44 aminoácidos del antígeno P64k de *N. meningitidis*.

TTCCATGGTAGATAAAAGAATGGCTTAG

29

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 3

TIPO DE SECUENCIA: Nucleotídica

LONGITUD: 29 bases

TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido sintético

PROPIEDADES: Cebador 3' No. 1575 para amplificación por RCP de los primeros 44 aminoácidos del antígeno P64k de *N. meningitidis*.

TTTCTAGATCCAAAGTAATCAGGGTATCG

29

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 4

TIPO DE SECUENCIA: Nucleotídica

LONGITUD: 26 bases

TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido sintético

PROPIEDADES: Cebador 3' No. 2192 para amplificación por RCP de los primeros 120 aminoácidos del antígeno P64k de *N. meningitidis*.

GGCGGTTCTGCCGATTAAGGATCCGA

26

21

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 5

TIPO DE SECUENCIA: Nucleotídica

LONGITUD: 146 pares de bases

TIPO DE CADENA: Doble

TIPO DE MOLÉCULA: Fragmento amplificado por RCP

CARACTERÍSTICAS: Posición 3 a 8, sitio de restricción NcoI; 139 a 144, sitio de restricción XbaI

PROPIEDADES: Derivado de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k de *N. meningitidis*; la introducción de los sitios de restricción provoca cambios en la secuencia nucleotídica del mismo.

TTCCATGGTAGATAAAAGAATGGCTTAGTTGAATTGAAAGTGCCGACATTGGCGGACA 60

CGAAAATGTAGATATTATCGCGGTTGAAGTAAACGTGGCGACACTATTGCTGTGGACGA 120

TACCTGATTACTTGGATCTAGAAA 146

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 6

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 47 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del antígeno P64k de *Neisseria meningitidis*

PROPIEDADES: Tiene los siguientes cambios respecto a P64K: L2→V2; E45→D45; T46→L46; D47→E47

MVDKRMALVELKVPDIGGHENVDIIAVEVNVDTIAVDDTLITLDLE

47

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 7

TIPO DE SECUENCIA: Nucleotídica

LONGITUD: 16 bases

TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido sintético.

CTAGATTGATATCAG

16

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 8

TIPO DE SECUENCIA: Nucleotídica

LONGITUD: 16 bases

TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido sintético

GATCCTGATATCAAAT

16

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 9

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Región central del lazo V3 de la gp120 del HIV-1, aislamiento LR150

SRGIRIGPGRAILAT

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 10

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Región central del lazo V3 de la gp120 del HIV-1, aislamiento JY1.

RQSTPIGLGQALYTT

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 11

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Región central del lazo V3 de la gp120 del HIV-1, aislamiento RF.

RKSITKGPGRVYAT

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 12

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Región central del lazo V3 de la gp120 del HIV-1, aislamiento MN.

RKRIHIGPGRAFYTT

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 13

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Región central del lazo V3 de la gp120 del HIV-1, aislamiento BRVA.

RKRITMGPGRVYYTT

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 14

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Región central del lazo V3 de la gp120 del HIV-1, aislamiento IIIB.

OSIRIQRGPGRAFVTI

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 15

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

23

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Secuencia consenso de la región central del lazo V3 de la gp120 de diferentes aislamientos del HIV-1, posición 7 dentro del PME TAB13.

TSITIGPGQVFYRTG

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 16

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 15 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Secuencia consenso de la región central del lazo V3 de la gp120 de diferentes aislamientos del HIV-1, posición 8 dentro del PME TAB13.

QRRTSIGQQQALYTT

15

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 17

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 5 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Espaciador flexible que separa los epitopos V3 en los PME TAB3, TAB4, TAB9 y TAB13

AGGGA

5

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 18

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 141 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Polipéptido multiepitópico (PME) TAB4

MAPTSSSTAQTQLQLEHLLLQLIFISRGIRIGPGRAILATAGGGARQSTPIGLGGALYT 60
 TAGGGARKSITKGPGRVIYATAGGGARKRIHIGPGRFYTTAGGGARKRITMGPGRVYYT 120
 TAGGGASIRIQRGPGRAFVTI 141

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 19

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 162 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Polipéptido multiepitópico (PME) TAB9

MVDKRMALVELKVPDIGGHENVDIIIAVEVNVDITIAVDDTLITLDLDSRGIRIGPGRAIL 60
 ATAGGGARQSTPIGLGGALYTTAGGGARKSITKGPGRVIYATAGGGARKRIHIGPGRFY 120
 TTAGGGARKRITMGPGRVYYTTAGGGASIRIQRGPGRAFVTI 162

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 20

TIPO DE SECUENCIA: Aminoacídica

LONGITUD: 202 aminoácidos

TIPO DE MOLÉCULA: Polipéptido multiepitópico (PME) TAB13

MVDKRMALVELKVPDIGGHENVDIIAVEVNVDGTDIAVDDTLITLDLDSRGIRIGPGRAIL 60
ATAGGGAROSTPIGLGOALYTTAGGGARKSITKGPGRVIYATAGGGARKRIHIGPGRFY 120
TTAGGGARKRITMGPGRVYTTAGGGARORTSIGOGOALYTTAGGGATSITIGPGOVFYR 180
TGAGGGASIRIQRGPGRAFVTI 202

NO. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 21

TIPO DE SECUENCIA: Nucleotídica

LONGITUD: 368 pares de bases

TIPO DE CADENA: Doble

TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido sintético

CARACTERÍSTICAS: Posición 1 a 6, sitio de restricción XbaI;
posición 363 a 368, sitio de restricción BamHI

PROPIEDADES: Codifica para los epitopos V3 unidos por el espaciador
AGGGA en el PME TAB9

TCTAGACTCGAGAGGCATTCTATCGGCCAGGTCGCGCAATTAGCAACAGCTGGCGG 60
TGGCGCACGTCAATCTACCCCTATTGGTTAGGTCAGGCTCTGTATACGACTGCCGGCGG 120
TGGTGCCCGCAAAAGTATCACCAAGGGTCCAGGCCCGTCATTACGCCACCGCGGGCGG 180
CGGTGCCCGTAAGCGTATCCACATTGGCCCAAGGCCGTGCATTCTATACTACAGCAGGTGG 240
TGGCGCACGTAAACGCATCACTATGGGCTGGTCGCGTCTATTACACGACCGCTGGCGG 300
CGGTGCTAGCATTGCACTCAACGCGGCCCTGGTCGTGCATTGTGACCATATGATAACG 360
CGGGATCC 368

REIVINDICACIONES

- 1.- Proteína de fusión caracterizada porque contiene un péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal del antígeno P64k de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15, la cual es fusionada a una proteína heteróloga.
- 5 2.- Una proteína de fusión según la reivindicación 1 caracterizada porque dicha proteína heteróloga es una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.
- 3.- Una proteína de fusión según la reivindicación 1 y 2 caracterizada porque dicha proteína heteróloga es la proteína Opc (5c) o la proteína PorA de *Neisseria meningitidis*.
- 10 4.- Una proteína de fusión según la reivindicación 1 caracterizada porque dicha proteína heteróloga es un polipéptido multiepitópico que incluye varias copias de la parte central de la región variable 3 (V3) de la proteína gp120 del VIH-1.
- 15 5.- Una proteína de fusión según la reivindicación 1 y 4 caracterizada porque dicha proteína heteróloga son los polipéptidos TAB4 y/o TAB9.
- 6.- Un método para la purificación de proteínas heterólogas caracterizado porque se basa en el empleo de polipéptidos de fusión en *Escherichia coli* mediante el uso de un péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal del antígeno P64k de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15 y que emplea un anticuerpo monoclonal específico para dicho estabilizador que permite la inmunodetección de cualquier proteína fusionada al mismo.
- 20 7.- Un método según la reivindicación 6 caracterizado porque la secuencia aminoacídica del péptido estabilizador se corresponde esencialmente con (NO. DE IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA: 6)
- 25

10 20 30 40 47

MVDKRMALVE LKVPDGGHE NVDIIAVEVN VGDTIAVDDT LITLDLE

- 8.- Un método según la reivindicación 6 caracterizado porque el anticuerpo monoclonal empleado para la purificación de la proteína de fusión es el denominado 448/30/7.
- 30 9.- Un método según la reivindicación 6 caracterizado porque la proteína heteróloga expresada es cualquier proteína que pueda ser empleada como inmunógeno en una preparación vacunal.

10.- Un método según la reivindicación 6 caracterizado porque la proteína heteróloga expresada son los polipéptidos multiepitópicos TAB4 y/o TAB9 ó las proteínas de la membrana externa Opc (5c) o PorA de *Neisseria meningitidis*.

11.- El anticuerpo monoclonal 448/30/7 caracterizado porque es específico para el 5 péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal del antigeno P64k de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15 y es empleado para la inmunodetección y la purificación de cualquier proteína fusionada al mismo.

12.- Un vector de expresión para la expresión de proteínas de fusión en *Escherichia coli* caracterizado porque contiene una secuencia que codifica para un péptido 10 estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal del antigeno P64k de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15, bajo el control del promotor triptófano de *Escherichia coli*, seguida por sitios de restricción XbaI, EcoRV y BamHI para la clonación en fase de fragmentos de ADN codificantes para polipéptidos de interés, y como terminador el de la transcripción del fago T4, así como un gen de 15 resistencia a ampicilina como marcador de selección.

13.- Un vector de expresión para la expresión de proteínas de fusión en *Escherichia coli* según la reivindicación 12, caracterizado porque contiene una secuencia que codifica para un péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal del antigeno P64k de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15, bajo el 20 control del promotor triptófano de *E. coli*, seguida por sitios de restricción XbaI, EcoRV y BamHI para la clonación en fase de fragmentos de ADN codificantes para proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

14.- Un vector de expresión para la expresión de proteínas de fusión en *Escherichia coli* según las reivindicaciones 12 y 13 caracterizado porque son los plasmidos pM- 25 80 y pM-82.

15.- Un vector de expresión para la expresión de proteínas de fusión en *Escherichia coli* según la reivindicación 12 caracterizado porque contiene una secuencia que codifica para un péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal del antigeno P64k de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15, bajo el 30 control del promotor triptófano de *Escherichia coli*, seguida por sitios de restricción XbaI, EcoRV y BamHI para la clonación en fase de fragmentos de ADN codificantes para polipéptidos multiepitópicos que incluyen varias copias de la parte central de la región variable 3 (V3) de la proteína gp120 del VIH-1.

16.- Un vector de expresión según las reivindicaciones 12 y 15 caracterizado porque son los plasmidios pTAB4 y pTAB9.

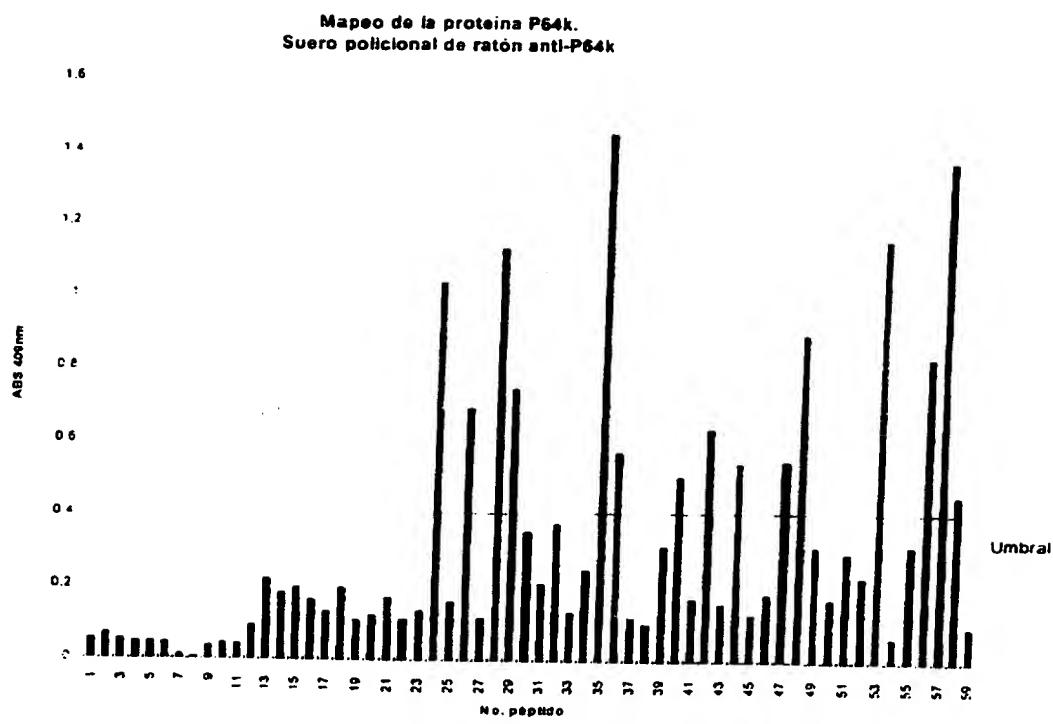
17.- Cepa de *Escherichia coli* recombinante caracterizada porque es obtenida como resultado de la transformación de cualquier cepa de *Escherichia coli* K-12 con los vectores pM-80, pM-82 así como pTAB4 y pTAB9 respectivamente, la cual exprese proteínas de fusión según las reivindicaciones 3 y 5.

18.- Uso de las proteínas de fusión según las reivindicaciones de la 1 a la 5 en preparados vacunales destinados al uso en humanos o animales.

19.- Composición vacunal caracterizada porque está constituida por la proteína de fusión de las reivindicaciones de la 1 a la 5 que contiene un antígeno heterólogico formado por un péptido estabilizador derivado de los primeros 47 aminoácidos del extremo N-terminal del antígeno P64k de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15 fusionado a una proteína heteróloga, así como un adyuvante apropiado.

FIG. 1

10	20	30	40	50	60	70
ATGCTAGATA	AAAGATGGC	TTAGTTGAA	TTGAAAGTC	CCGACATTG	CGGACACGAA	AATGTAGATA
80	90	100	110	120	130	140
TTATCCGGT	TGAAGTAAAC	GTGGCGACA	CTATTGCTGT	GGACGATACC	CTGATTACTT	TGGAAACCGA
150	160	170	180	190	200	210
TAAAGCGACT	ATGGACGTAC	CTGCTGAAGT	TGCAGGCGTA	CTCAAAGAAG	TTAAAGTTAA	AGTCGGCGAC
220	230	240	250	260	270	280
AAAATCTCTG	AAGGTGGTTT	GATTGTCGTC	GTTGAAGCTG	AAGGCACCGC	AGCCGCTCCT	AAAGCCGAAG
290	300	310	320	330	340	350
CGGCTCCGC	CCCCGGCAA	GAAGCCCCTA	AAGCTGCCGC	TCCTGCTCCG	CAAGCCGCGC	AATTCCGGCGG
360	370	380	390	400	410	420
TTCTGCCGT	GCCGAGTACG	ACGTGGTCGT	ATTGGGTGGC	GGTCCCGGCG	GTTACTCCGC	TGCATTTGCC
430	440	450	460	470	480	490
GCTGCCGATG	AAGGCTGAA	AGTCGCCATC	GTCGAACGTT	ACAAAACTTT	GGGGGGCGTT	TGCCTGAACG
500	510	520	530	540	550	560
TCGGCTGTAT	CCCTTCCAAA	GCCTTGTGTC	ACAATGCCGC	CGTTATCGAC	GAAGTGCGCC	ACTTGGCTGC
570	580	590	600	610	620	630
CAACGGTATC	AAATACCCCCG	AGCCGGAAC	CGACATCGAT	ATGCTTCGCG	CCTACAAAGA	CGCGTAGTT
640	650	660	670	680	690	700
TCCCGCCTCA	CGGGCGTTT	GGCAGGTATG	GCGAAAAGCC	GTAAAGTGA	CGTTATCCAA	GGCGACGGGC
710	720	730	740	750	760	770
AATTCTTAGA	TCCGCACCAC	TTGGAAGTGT	CGCTGACTGC	CGGCACGCG	TACGAACAGG	CAGCCCCTAC
780	790	800	810	820	830	840
CGGCGAGAAA	AAAATCGTTG	CCTTCAAAAA	CTGTATCATT	GCAGCAGGCA	GCCCGTAAC	CAAACCTGCCT
850	860	870	880	890	900	910
TTCATTCTG	AAGATCCGCA	CATCATCGAT	TCCAGGGCG	CATTGGCTCT	GAAAGAAGTA	CCGGGCAAAC
920	930	940	950	960	970	980
TCCTGATTAT	CGCGGGCGGC	ATTATCAGCC	TCGAGATGGG	TACGGTTTAC	AGCACGCTGG	GTTCGCGTTT
990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
GGATGTGGTT	GAAATGATGG	ACGGCCTGAT	GCAAGGCCA	GACCGCGATT	TGGTAAAAGT	ATGGCAAAAAA
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
CAAAACGAAT	ACCGTTTTGA	CAACATTATG	GTCAACACCA	AAACCGTTGC	AGTTGAGCCG	AAAGAAGACG
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
GCGTTTACGT	TACCTTTGAA	GGCGCGAACG	CGCCTAAAGA	GCGCAGACGC	TACGATGCCG	TATTGGTTGC
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
CGCCGGCCGC	GCGCCCAACG	GCAAACTCAT	CAGCGCGGA	AAAGCAGGCG	TTGCCGTAAC	CGATCGCGGC
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
TTCATCGAAG	TGGACAAACA	AATGCGTACC	AATGTGCCG	ACATCTACGC	CATCGCGAC	ATCGTCGGTC
1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
ACCCGATGTT	GGCGCACAAA	GCCGTTCACG	AAGGCCACGT	TGCCGCCGA	AACTGCGCCG	GCCACAAAGC
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
CTACTTCGAC	GCACCGCTGA	TTCCGGCGT	TGCTTACACT	TCCCCCGAAG	TGGCGTGGGT	GGGCAGAACCC
1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
GAACGTGTCGG	CCAAAGCCTC	CGGCCGCAAA	ATCACCAAAG	CCAACTTCCC	GTGGCGGCT	TCCGGCCGTG
1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
CGATTGCCAA	CGGTTGCGAC	AACGGCTTTA	CCAAGCTGAT	TTTTGATGCC	GAAACCGGCC	GCATCATCGG
1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
CGGGCGCATT	GTCGGTCCGA	ACGGTGGCGA	TATGATCGGC	GAAGTCTGCC	TTGCCATCGA	AATGGGCTGC
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
GACCGGGCAC	ACATCGGCAA	AACCATCCAC	CCGCACCCGA	CCTTGGCGA	ATCCATCGGT	ATGGCGCGG
1760	1770	1780	1790	1797		
AACTGGCATT	GGGTACTTGT	ACCGACCTGC	CTCCGCAAAA	GAAAAAA		

FIG. 2

3/12

FIG. 3

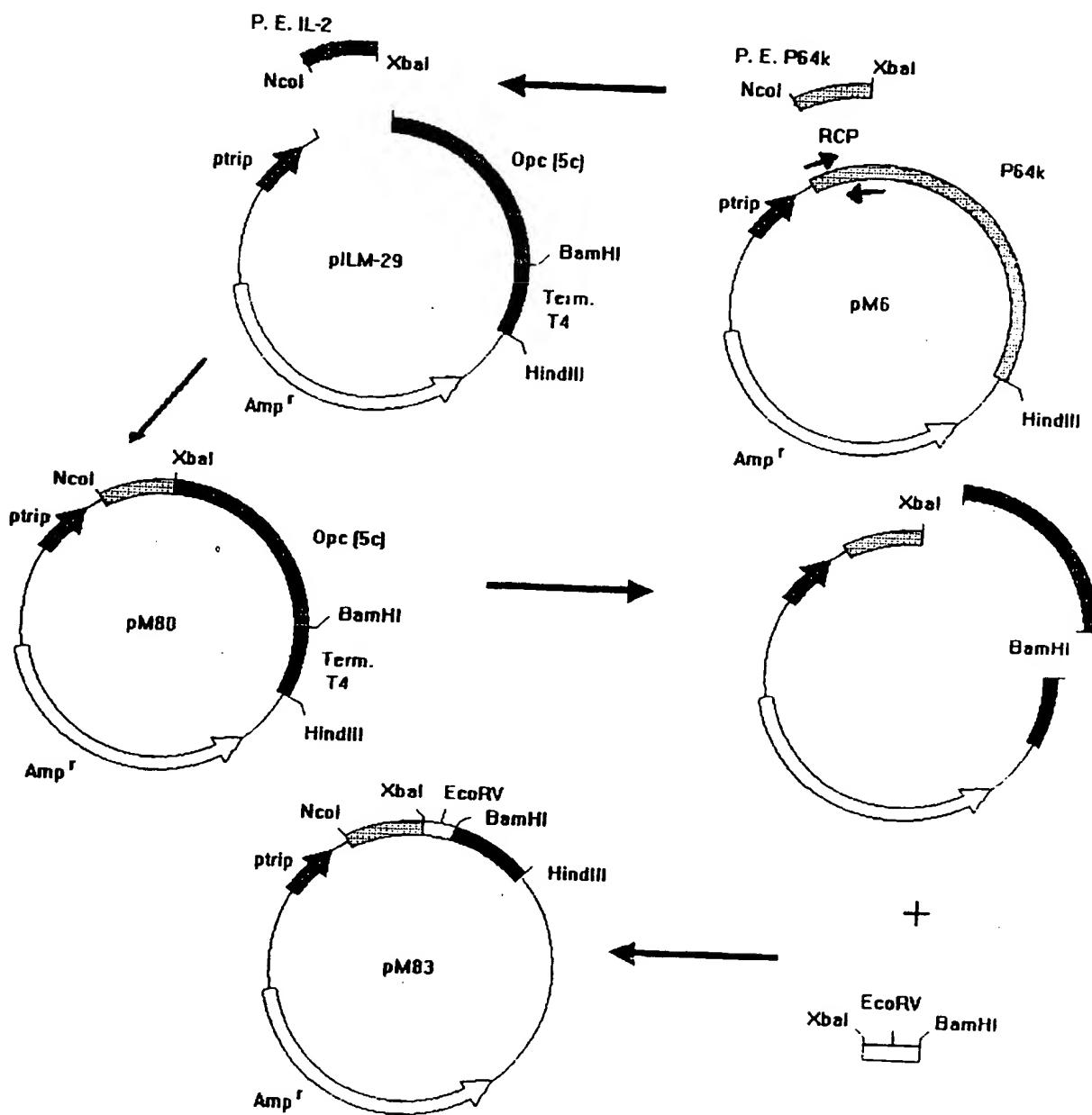
4

5' TTCC

M	V	D	K	R	16	M	A	L	25	V	E	L	34	K	V	P	43	D	I	G	G	H	
ATG	GTA	GAT	AAA	AGA	ATG	GCT	TTA	GTT	GAA	TTG	AAA	GTG	CCC	GAC	ATT	GGC	GGA	CAC					
E	N	V	D	I	61	I	A	V	70	E	V	N	88	V	G	97	D	T	I	106	A	V	115
GAA	AAT	GTA	GAT	ATT	ATC	GCG	GTT	GAA	GTA	AAC	GTG	GGC	GAC	ACT	ATT	GCT	GTG	GAC					
D	T	L	I	T	124	L	D	L	133	E			142										
GAT	ACC	CTG	ATT	ACT	TTG	GAT	CTA	GAA	A					3'									

4/12

FIG. 4



5/12

FIG. 5

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Poisson Probability	
		P(N)	N
KPY1_HUMAN PYRUVATE KINASE, M1 (MUSCLE) ISOZYME (EC 2.7.1.40)	51	0.98	1
KPY1_RAT PYRUVATE KINASE, M1 (MUSCLE) ISOZYME (EC 2.7.1.40)	51	0.98	1
KPY2_HUMAN PYRUVATE KINASE, M2 ISOZYME (EC 2.7.1.40)	51	0.98	1
KPY2_RAT PYRUVATE KINASE, M2 ISOZYME (EC 2.7.1.40)	51	0.98	1

>KPY1_HUMAN PYRUVATE KINASE, M1 (MUSCLE) ISOZYME (EC 2.7.1.40) (CYTOSOLIC THYROID HORMONE-BINDING PROTEIN).
Length = 530

Query: 29 VN VNGDTIAVDDTLITLDL 46
V+VG I VDD LI+L++
Sbjct: 167 VEVGSKIYVDDGLISLQV 184

>KPY1_RAT PYRUVATE KINASE, M1 (MUSCLE) ISOZYME (EC 2.7.1.40).
Length = 530

Query: 29 VN VNGDTIAVDDTLITLDL 46
V+VG I VDD LI+L++
Sbjct: 167 VEVGSKIYVDDGLISLQV 184

>KPY2_HUMAN PYRUVATE KINASE, M2 ISOZYME (EC 2.7.1.40).
Length = 530

Query: 29 VN VNGDTIAVDDTLITLDL 46
V+VG I VDD LI+L++
Sbjct: 167 VEVGSKIYVDDGLISLQV 184

>KPY2_RAT PYRUVATE KINASE, M2 ISOZYME (EC 2.7.1.40).
Length = 530

Query: 29 VN VNGDTIAVDDTLITLDL 46
V+VG I VDD LI+L++
Sbjct: 167 VEVGSKIYVDDGLISLQV 184

6/12

FIG. 6

Smallest

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:				Reading Frame	High Score	Poisson Probability P(N)	Poisson Probability N
CFMUCIN	Canis familiaris (clone pCTM-A)	mucin c-term...	-2	62	0.30	1	
HS8671	EST02755	Homo sapiens cDNA clone HFBCA72	sim...	-2	61	0.40	1

>CFMUCIN Canis familiaris (clone pCTM-A) mucin c-terminus RNA, 3' end.
Length = 1733

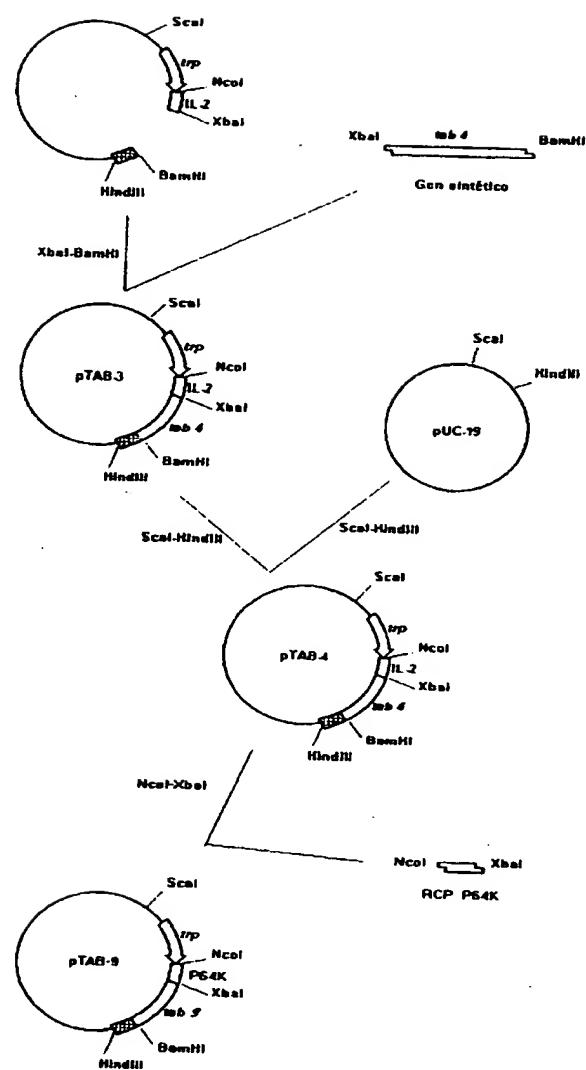
Query: 8 LVELKVPDIGGHENVDIIIAVEVNVGDTIAYDD 39
L E+ VPD H V+++A E+ +G+++ VDD
Sbjct: 1015 LREVQVPDRKLHKGVQLLAGELGIGEALQVDD 920

>HS8671 EST02755 Homo sapiens cDNA clone HFBCA72 similar to Mucin CTM-A.
Length = 286

Query: 8 LVELKVPDIGGHENVDIIIAVEVNVGDTIAYDD 39
L E+ VPD HE V++++ E+ VG VDD
Sbjct: 240 LREVQVPDRKLHEGVQLLSGELGVGKXFQVDD 145

7/12

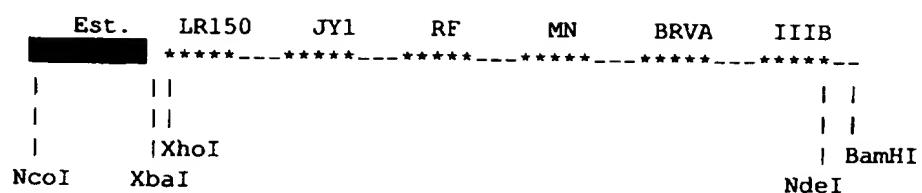
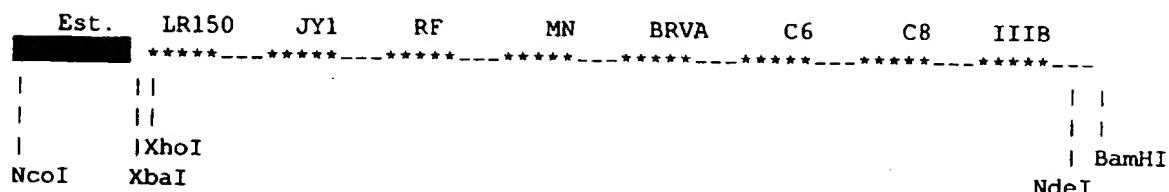
FIG. 7



8/12

FIG. 8

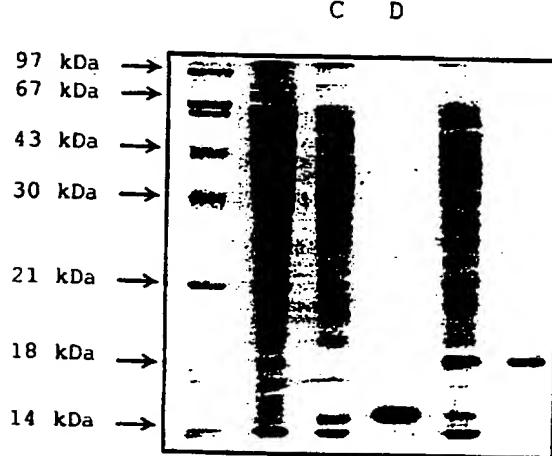
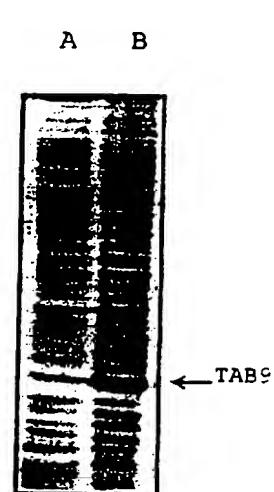
9/12

FIG. 9**A****B**

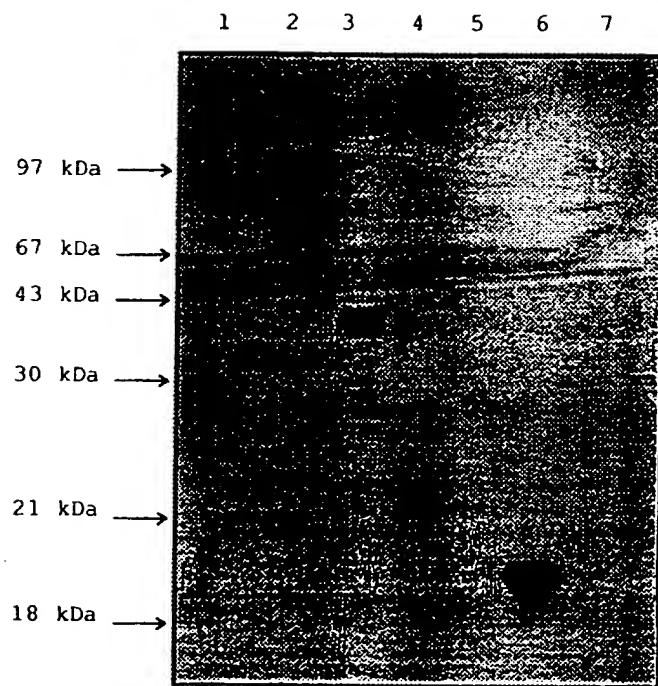
10/12

FIG. 10**A**

Gene	Construct	Plasmid	Reactivity	Relative expression
<i>porA</i>	hIL2-58	pILM28	M9	32
	P64k-47	pM82	M9	34
<i>opc</i>	hIL2-58	pILM29	M9	25
	P64k-47	pM80	M9	20
<i>TAB</i>	hIL2-22	pTAB4	LB	5
	P64k-47	pTAB9	LB	10

B**C**

11/12

FIG. 11

12/12

FIG. 12

RABBIT#	12166	5725	5340	2310	1	2	3	10
TAB	20480	10240	10240	81920	20480	20480	51200	51200
	0	0	0	0	0	0		
LR150	<100	<100	<100	6400	400	<100	800	<100
JY1	200	<100	<100	12800	1600	6400	3200	<100
RF	6400	<100	3200	800	<100	200	3200	800
MN	200	<100	<100	1600	1600	3200	6400	<100
BRVA	<100	6400	400	3200	800	400	6400	1600
IIIB	<100	<100	<100	<100	800	<100	800	<100
GM		1820					1416	
R%		45.8%					75%	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte
nal Application No
PCT/CU 97/00001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6. C12N15/62 C12N15/31 C12N15/48 C07K14/22 C07K14/16
 C07K16/12 C07K1/22 A61K39/095 C12N15/70 C12N1/21
 // (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 474 313 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 11 March 1992 cited in the application see page 5, line 42 - page 7, line 37; examples 7,10 ---	1-19
A	WO 90 14431 A (BIOTECHNOLOGY RESERACH AND DEVELOPMENT CORPORATION) 29 November 1990 cited in the application see page 9, paragraph 2 - page 10, paragraph 1 see page 10, paragraph 3 see page 11, paragraph 2 - paragraph 3 see page 17, last paragraph - page 21, paragraph 4 see page 26, last paragraph - page 27, paragraph 1 ---	1-19

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

3 Date of the actual completion of the international search

18 June 1997

Date of mailing of the international search report

01.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten tional Application No
PCT/CU 97/00001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOTECNOLOGÍA APLICADA, vol. 12, no. 2, 1995, page 72 XP000671542 GERARDO GUILLÉN ET AL.: "Cloning, expression and characterization of the P64k outer membrane protein from <i>N.</i> <i>meningitidis</i>" see the whole document</p> <p>---</p>	1-19
A	<p>PROTEINS STRUCTURE FUNCTION AND GENETICS 21 (4). 1995. 303-306. ISSN: 0887-3585, XP000671539 BRINGAS R ET AL: "A Lipoamide Dehydrogenase From <i>Neisseria meningitidis</i> has a Lipoyl Domain." see the whole document</p> <p>-----</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1. International application No.

PCT/CU 97/00001

Box I - Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter	nal Application No
PCT/CU 97/00001	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 474313 A	11-03-92	AT 152175 T		15-05-97
		AU 657487 B		16-03-95
		AU 8368391 A		12-03-92
		CA 2050749 A		08-03-92
		DE 69125769 D		28-05-97
		JP 6169779 A		21-06-94
		US 5286484 A		15-02-94
<hr/>				
WO 9014431 A	29-11-90	AU 647025 B		17-03-94
		AU 5827090 A		18-12-90
		CA 2057908 A		20-11-90
		EP 0472658 A		04-03-92
		JP 4507341 T		24-12-92
		US 5252466 A		12-10-93
<hr/>				

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CU 97/00001

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

Int.Cl. 6 : C12N15/62 C12N15/31 C12N15/48 C07K14/22 C07K14/16 C07K16/12
C07K1/22 A61K39/095 C12N15/70 C12N1/21 // (C12N1/21, C12R1:19)

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

Int.Cl. 6 : C07K C12N A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
A	EP 0 474 313 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 11 marzo 1992 (11.03.92) citado en la solicitud ver página 5, línea 42 - página 7, línea 37; ejemplos 7,10 ---	1-19
A	WO 90 14431 A (BIOTECHNOLOGY RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION) 29 noviembre 1990 (29.11.90) citado en la solicitud ver página 9, párrafo 2 - página 10, párrafo 1 ver página 10, párrafo 3 ver página 11, párrafo 2 - párrafo 3 ver página 17, último párrafo - página 21, párrafo 4 ver página 26, último párrafo - página 27, párrafo 1 ---	1-19 -/-

En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

Véase el Anexo de la familia de patentes.

- * Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada
- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 18 junio 1997 (18.06.97)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 01 julio 1997 (01.07.97)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office Facsimil N°	Funcionario autorizado Teléfono N°

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 97/00001

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
A	BIOTECNOLOGIA APLICADA, vol. 12, no. 2, 1995, página 72 XP000671542 GERARDO GUILLÉN ET AL.: "Cloning, expression and characterization of the P64k outer membrane protein from <i>N.</i> <i>meningitidis</i> " ver el documento completo ---	1-19
A	PROTEINS STRUCTURE FUNCTION AND GENETICS 21 (4). 1995. 303-306. ISSN: 0887-3585, XP000671539 BRINGAS R ET AL: "A Lipoamide Dehydrogenase From <i>Neisseria meningitidis</i> has a Lipoyl Domain." ver el documento completo -----	1-19

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud internacional N°
PCT/CU 97/00001**Recuadro I Observaciones cuando no han podido efectuarse búsquedas sobre ciertas reivindicaciones (continuación del punto 1 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido respecto de ciertas reivindicaciones, en virtud del Artículo 17.2a), por las razones siguientes:

1. Reivindicaciones Nos.: **18**
debido a que se refieren a objetos para los que no se ha solicitado a esta Administración su búsqueda, concretamente:
Nota: aunque la reivindicación 18 se refiere a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido hecha y basada sobre los efectos alegados del compuesto/de la composición
2. Reivindicaciones Nos.:
debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las exigencias prescritas, de forma que no puede realizarse una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. Reivindicaciones Nos.:
debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta la unidad de la invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha encontrado invenciones múltiples en esta solicitud internacional, como se indica a continuación:

1. Debido a que todas las tasas adicionales de búsqueda exigidas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones para las que puede efectuarse la búsqueda.
2. Debido a que puede efectuarse la búsqueda respecto de todas las reivindicaciones susceptibles de búsqueda sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Administración no invita a pagar ninguna tasa adicional.
3. Debido a que sólo algunas de las tasas adicionales de búsqueda requeridas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca únicamente las reivindicaciones para las que fueron pagadas las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. El solicitante no pagó en su momento las tasas adicionales de búsqueda requeridas. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; abarca las reivindicaciones Nos.:

Observación sobre protesta Las tasas de búsqueda adicional fueron acompañadas por protesta del solicitante.
 Ninguna protesta acompañó al pago de las tasas de búsqueda adicional.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/CU 97/00001

Documento de patente citad en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 474313 A	11-03-92	AT 152175 T AU 657487 B AU 8368391 A CA 2050749 A DE 69125769 D JP 6169779 A US 5286484 A	15-05-97 16-03-95 12-03-92 08-03-92 28-05-97 21-06-94 15-02-94
WO 9014431 A	29-11-90	AU 647025 B AU 5827090 A CA 2057908 A EP 0472658 A JP 4507341 T US 5252466 A	17-03-94 18-12-90 20-11-90 04-03-92 24-12-92 12-10-93